

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-46285

⑤ Int. Cl.

C 12 N 9/04

識別記号

Z

庁内整理番号

7823-4B

⑬ 公開 平成2年(1990)2月15日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 植物由来2-オキソアルデヒドレダクターゼ

⑯ 特 願 昭63-196148

⑰ 出 願 昭63(1988)8月8日

特許法第30条第1項適用 昭和63年3月15日、財団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌62巻3号」において発表

⑱ 発 明 者	加 藤 博 通	東京都中野区上鷲宮 2-21-3
⑲ 発 明 者	早 瀬 文 孝	東京都杉並区松庵 3-26-36
⑳ 発 明 者	西 村 敏 英	埼玉県蕨市南町 1-9-15 北田コーポ101
㉑ 発 明 者	梁 智 群	東京都文京区後染 1-5-3 日中友好会館163室
㉒ 出 願 人	財団法人糧食研究会	東京都東村山市栄町 1-21-3
㉓ 代 理 人	弁理士 平木 祐輔	外1名

明 細 書

1. 発明の名称

植物由来2-オキソアルデヒドレダクターゼ

2. 特許請求の範囲

3-デオキシグルコソンを不活性化し、さらにメチルグリオキサールを不活性化する植物由来2-オキソアルデヒドレダクターゼ。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、蛋白質と糖によるメイラード反応、所謂褐変反応の中間生成物である3-デオキシグルコソンを代謝し、さらには細胞代謝物でありながら強い細胞毒性を示すとされているメチルグリオキサールを不活性化する植物由来の2-オキソアルデヒドレダクターゼに関するものである。

褐変化蛋白質は、プロテアーゼ作用を受けにくく、消化吸収率が低下しており栄養価が劣る。また、生体内のヘモグロビン、クリスタリン、コラーゲンなどの蛋白質もメイラード反応により重合、不溶化、蛍光発生、着色するところから、老化、

成人病発症との関連が推論されている。

一方、メチルグリオキサールは、蛋白質、RNA、DNAの合成阻害及びDNAの修飾も行なう他、変異原性のあることも知られており、細胞増殖にとってこのメチルグリオキサールの存在は極めて不利である。

本発明の植物由来2-オキソアルデヒドレダクターゼは、反応性に富むこれらの2-オキソアルデヒドを不活性化し、食品及び生体内褐変反応進行の抑制、細胞毒性作用の排除に役立つ新規な酵素である。

(従来の技術)

蛋白質と糖によるメイラード反応、所謂褐変反応は、蛋白質のN-末端アミノ基およびリジン残基のε-アミノ基が、シッフ塩基を経てアマドリ転位を起こした型に修飾された後、これが分解して2-オキソアルデヒド、特に3-デオキシグルコソンを生成し、これが二次的にリジン、アルギニン、トリプトファン残基と反応して架橋を形成し、重合、蛍光発生、褐変を引き起こす一連の反

応である。

食品においては、メイラード反応により、必須アミノ酸であるリジン、トリプトファンが損失するだけでなく、重合することによりプロテアーゼ作用を受けにくくなり消化吸収率が低下する。

一方、生体内においても、このメイラード反応は進行し、コラーゲンのような代謝回転の遅い蛋白質がメイラード反応により褐変、重合したときに伴う硬化、代謝遅延と老化や成人病との関連、或いは代謝回転することのない特殊蛋白質である眼球レンズのクリスタリンの不透明化と糖尿病による白内障との関連などが議論されている。また、生体内で修飾、重合した蛋白質は、代謝を受けにくくなり、血管壁に沈着すると動脈硬化の原因となる可能性もある。このように生体内で生じたメイラード反応生成物は、老化や成人病の発症と関連があると考えられるところから、生体にとっては都合の悪い物で、これを排除する必要がある。

このメイラード反応の重要な中間体である3-デオキシグルコソンを代謝する酵素として、3-

デオキシグルコソンと同じく分子内にカルボニル基とアルデヒド基を有し、反応性に富む細胞増殖阻害物質であるメチルグリオキサルを代謝する2-オキソアルデヒドデヒドロゲナーゼとメチルグリオキサルレダクターゼが既に知られている。

メチルグリオキサールの分解に関与している酵素系は数種あり〔蛋白質 核酸 酵素 31(11)1010~1021〕、補酵素グルタチオンからなるグリオキサラーゼにより乳酸に転換する経路、メチルグリオキサル還元酵素により、ラクトアルデヒドを経て乳酸に転換する経路、メチルグリオキサル脱水素酵素により、直接ピルビン酸に転換する経路が明らかにされている。これらの酵素は、多くの微生物及び動物の脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓などに見出されている。また、グリオキサラーゼ系については植物にも見出されている。しかし、メチルグルオキサルに反応して、アセトールに転換する酵素はまだ報告されていない。

〔発明が解決しようとする課題〕

上述したように、3-デオキシグルコソンは、

メイラード反応における主要な中間体であり、またメチルグリオキサルは、細胞増殖阻害物質として知られている。

本発明は、これら2-オキソアルデヒドに作用して、アルデヒド基を還元し、これら2-オキソアルデヒドを不活性化し、これまで全く報告されていない新規な酵素である植物由来2-オキソアルデヒドレダクターゼを提供するという課題を解決したものである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは、これまでに検索されたことのない2-オキソアルデヒドを不活性化し、植物由来の2-オキソアルデヒドレダクターゼを求めて鋭意研究を進めた結果、新鮮な食用植物に緩衝液を加え磨砕して得た粗抽出物中に目的する2-オキソアルデヒドレダクターゼが存在することを見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明は3-デオキシグルコソンを不活性化し、さらにメチルグリオキサルを不活性化し、植物由来2-オキソアルデヒドレダクターゼである。

上記3-デオキシグルコソンは蛋白質-糖系メイラード反応に於ける主要な中間体であり、またメチルグリオキサルは細胞の代謝及び増殖に関与する化合物である。

以下本発明について詳細に説明する。

本発明の2-オキソアルデヒドレダクターゼ(以下、本発明酵素という)は、例えばカブ、セリ、レタス、ミツバ、チンゲンサイ、ネギ、ホウレンソウ、シュンギク、ニラ、パセリ、ブロッコリー、食用菊などの植物の根、茎、葉または花などから、例えば次のようにして得ることができる。

上記植物の根、茎、葉、または花などに、適量(2倍量)の緩衝液、例えば β -メルカプトエタノールを含む磷酸緩衝液を加え、磨砕もしくはホモゲナイズし、適当な手段で例えば濾過、遠心分離などで液分を分離するか、あるいはさらにこの液分を同じ緩衝液で透析して粗抽出物を得る。

この粗抽出物を、塩安飽和、透析、カラム処理、例えばDEAE-セルロース、セファデックス(Sephadex) G-100、ヒドロキシルアパタイト(Hyd-

roxyapatite) などのカラム処理などを適当に組合わせて処理することにより、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)で単一なバンドを示す精製酵素を得ることができる。

本発明酵素の理化学的性質を示すと次のとおりである。

① 作用

3-デオキシグルコソソ、メチルグリオキサルなどの2-オキソアルデヒドに作用してアルデヒド基を還元する。

② 基質特異性

3-デオキシグルコソソ、メチルグリオキサル、フェニルグリオキサルなどの2-オキソアルデヒドの他、グリセルアルデヒドなどのアルデヒドにも活性を示すが、ジアセチル、ジヒドロキシアセトンなどのケトンには活性を示さない。

③ 至適pH及び安定pH

至適pH 7~7.5

安定pH 6~8

④ 阻害、活性化及び安定化

オキシグルコソソ及び0.3mM NADPHと共に30℃でインキュベートし、340nmにおけるODを測定する。

本発明酵素による還元生成物について分析した結果、メチルグリオキサルからアセトール(Acetol)が、3-デオキシグルコソソからは3-デオキシフラクトース(3-deoxyfructose)が生成した。2-オキソアルデヒドに作用して、アルデヒド基を還元する酵素はこれまで報告されていないので、本発明酵素は新規な酵素と認められる。

(発明の効果)

本発明の酵素は、蛋白質と糖によるメイラード反応、所謂褐変反応の中間生成物である3-デオキシグルコソソ、細胞増殖阻害物質として知られているメチルグリオキサルなどの2-オキソアルデヒドに作用してこれら2-オキソアルデヒドを不活性化し、食品及び生体内褐変反応進行の抑制、細胞毒性作用の排除に役立つので、非常に有用な酵素である。

(実施例)

0.1mMのPCMB(p-クロロマーキュリーベンゾイックアシド)で完全に阻害される。

SH還元剤により安定化される。

糖酵素としてNADPHのみを要求する。

⑤ 分子量

ゲル濾過法で67K、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で35K。

⑥ 精製方法

硫酸飽和、透析、カラム処理、例えばDEAE-セルロース、セファデックスG-100、ヒドロキシルアパタイトなどのカラム処理を適当に組合わせて精製する。精製の具体例は後記実施例2に記載のとおりである。

⑦ 作用適温 30℃

⑧ pH、温度などによる失活の条件

pH 5~9で10分間安定。

pH 3では5分、pH 10では10分間で失活する。

(比較的不安定である)

⑨ 力価の測定方法

100mM磷酸緩衝液(pH 7.4)中で4mMの3-デ

以下に本発明の実施例を示す。

実施例1

下記第1表に記載の植物の葉(7種)および花(2種)のそれぞれ75gに2倍量の10mMβ-メルカプトエタノール(MCE)を含む20mM磷酸緩衝液(pH 7.2)を加え、3分位ホモゲナイズした後、12,000Gで遠心分離して上澄液を得、これを上記と同じ緩衝液で透析して(透析内液又は外液)粗酵素抽出物(CE)を得た。

このCEの3-デオキシグルコソソ(3-GD)とメチルグリオキサル(MG)に対する代謝活性を、補酵素NADPH、NADH、NADP、NAD存在下、100mM 磷酸緩衝液(pH 7.4)中で、CEを各基質に30℃で作用させた時の補酵素の変化量を5~10分間 340nmにおける吸光度の変化で測定した結果を第1表に示す。なお表中の数値は植物組織1g当りに存在する酵素の活性量を示す。

(本頁以下余白)

第 1 表

MGまたは3-DGを基質とした時の各種植物の
2-オキソアルデヒドレダクターゼ活性*

	NADH依存性 レダクターゼ(pH7.4)		NADPH依存性 レダクターゼ(pH7.4)	
	MG	3-DG	MG	3-DG
葉				
カブ	7	31	34	58
セリ	9	35	27	57
レタス	9	21	20	36
ミツバ	7	28	35	56
チンゲンサイ	14	32	42	58
ネギ	14	30	54	60
ホウレンソウ	26	35	73	82
シュンギク	7	32	36	59
ニラ	29	31	93	86
バセリ	17	10	135	174
花				
ブロッコリー	20	26	76	63
食用菊	14	21	24	41

* nmol/min/g tissue

カリウムの濃度傾斜法により酵素を溶出した。このようにしてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)で単一なバンドを示す精製された本発明酵素0.5 mgを得た。

この酵素を10mM磷酸緩衝液(pH7.4)中で15mMの下記第2表に記載の基質及び0.3mM・NADPHと共に30℃でインキュベートしたとき、3-デオキシグルコソンの活性値を100%とした場合の各基質の相対的活性値を示すと、第2表のとおりである。

(本頁以下余白)

第1表から全てのCEにおいて、3-GD、MGに対するNADPH又はNADH依存性のレダクターゼ活性が認められる。

しかしいずれの植物のCEも、3-GD、MGに対して、NADP、又はNAD依存性の、これまで肝臓で報告されている2-オキソアルデヒド脱水素酵素活性は全く認められなかった。

実施例2

実施例1に記載のようにしてバセリの葉から得たバセリのCE 167mlを45~70%硫酸飽和して沈澱した画分30mlを、10mMβ-メルカプトエタノール含有の20mM磷酸緩衝液に透析した後、透析内液を上記緩衝液で平衡化したDEAE-セルロースカラムにかけた。非吸着蛋白質を溶出した後、食塩濃度傾斜法にて酵素を溶出した。得られた活性画分を限外口過膜を用いて濃縮した後、セファデックスG-100のカラムにかけた。つぎにこのカラムから溶出した活性画分を上記緩衝液に透析した後、さらにこの透析内液を濃縮した。この濃縮物をヒドロキシアパタイトのカラムにかけ、リン酸

第 2 表

基 質	相 対 的 活 性 値	基 質	相 対 的 活 性 値
3-デオキシグルコソン	100 %	アラビノース	0 %
フェニルグリコキナール	98.1	グリシロキシアセトン	0
メチルグリコキナール	40.8	アセトール	0
DL-グリセルアルデヒド	39.7	フラクトース	0
グリコキナール	19.4	グルコース	0
グルタールアルデヒド	17.9	グルコノラクトン	0
2,3-ペンタンジオン	12.1	D-グルコノラクトン	0
アセトアルデヒド	0.35		

出願人 財団法人 糧食研究会
代理人 弁理士 平 木 祐 輔
同 弁理士 石 井 真 次